

Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 0103-9865
Maio, 2010*

Documentos 136

Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos

Ana Karina Dias Salman
Angela Cristina Dias Ferreira
João Paulo Guimarães Soares
Josilane Pinto de Souza

Porto Velho, RO
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127, CEP 76815-800, Porto Velho, RO
Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Cléber de Freitas Fernandes*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes-Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2010): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia

Metodologia para avaliação de ruminantes / Ana Karina Dias
Salman ... [et al].-- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia,
2010.

21 p. -- (Documentos / Embrapa Rondônia, 0103-9865; 136)

1. Ciência e tecnologia de alimentos. 2. Alimentação animal.
3. Bovinos. I. Salman, Ana Karina Dias. II. Ferreira, Ângela
Cristina Dias. III. Soares, João Paulo Guimarães. IV. Souza,
Josilane Pinto de Souza. V. Título. VI. Série.

CDD (21.ed.) 636.213

© Embrapa - 2010

Autores

Ana Karina Dias Salman

Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia, pesquisadora da
Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO
aksalman@cpafro.embrapa.br

Angela Cristina Dias Ferreira

Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia, Professor Adjunto,
Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE
acrisdias@ufs.br

João Paulo Guimarães Soares

Zootecnista, D.Sc. em Zootecnia, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF
jp.soares@cpac.embrapa.br

Josilane Pinto de Souza

Zootecnista, Mestranda no Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e
Mucuri, Diamantina, MG
josilane@zootecnista.com.br

Sumário

Introdução	7
Métodos químicos	9
Método de Weende	9
Sistema de nutrientes digestíveis totais (NDT)	11
Método de Van Soest	12
Determinação de minerais	12
A tecnologia NIRS (Near Infra Red System)	13
Métodos biológicos	13
Digestibilidade	13
<i>Métodos diretos</i>	14
<i>Métodos indiretos com uso de indicadores ou marcadores</i>	16
<i>Métodos indiretos in situ</i>	19
Considerações finais	19
Referências	20

Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos

Ana Karina Dias Salman

Angela Cristina Dias Ferreira

João Paulo Guimarães Soares

Josilane Pinto de Souza

Introdução

A principal meta da produção animal é produzir alimento para o homem em quantidade, qualidade e ao menor custo. Porém, com os avanços médicos-científicos, as condições de vida da população humana melhoram consideravelmente, resultando em crescimento populacional que superou a capacidade de produção de alimentos e incitou pesquisadores na busca por soluções práticas para aumentar a eficiência dos sistemas de produção animal, com resultados que sejam simultaneamente favoráveis do ponto de vista econômico, social e ambiental.

Como a alimentação é responsável por uma parcela significativa do custo total de produção, a procura por alimentos mais eficientes e econômicos para serem utilizados na alimentação animal é constante e, dentre os alimentos para animais domésticos, os protéicos são os de custo mais elevado uma vez que a maioria concorre com a alimentação humana.

O ruminante possui um sistema digestivo composto por cavidades pré-gástricas em que microrganismos simbióticos permitem o aproveitamento dos nutrientes contidos em alimentos fibrosos e grosseiros por meio de um processo fermentativo. Por esse motivo, são considerados animais de grande eficiência digestiva e especialização para obter a energia necessária para seus processos fisiológicos e, conseqüentemente, para produção de produtos de interesse econômico como carne, leite, couro e lã. Diante disso, são imprescindíveis os estudos para avaliação de subprodutos e resíduos lignocelulósicos como fontes alternativas a serem utilizadas na alimentação de ruminantes.

Apesar de o desempenho animal ser dependente de fatores genéticos e ambientais, sabe-se que a eficiência alimentar é um fator importante no desenvolvimento dos animais, sobretudo quando se considera o uso de rações que possibilitam o máximo crescimento. Nesse caso, deve-se levar em consideração não apenas um único nutriente presente na ração, mas seu conjunto, suas interações, assim como, a ingestão máxima dos mesmos.

Dentre os fatores nutricionais que interferem no desempenho animal, a composição químico-bromatológica dos ingredientes de uma dieta, o consumo voluntário, as cinéticas de degradação e a digestibilidade dos nutrientes são os que normalmente são citados como mais limitantes.

De acordo com os resultados das análises químico-bromatológicas, os alimentos podem ser classificados da seguinte maneira:



Fonte: Andrigueto et al. (1982)

Volumosos: apresentam baixo teor energético por unidade de volume, ou seja, possuem teor de fibra bruta (FB) superior a 18% na matéria seca (MS) e podem ser divididos em **secos** e **úmidos**. Os fenos e as palhas são classificados como volumosos secos (Inferiores 10%-12% umidade), enquanto os capins verdes, as silagens e a cana-de-açúcar são considerados volumosos úmidos (superiores a 10%-12% umidade).

Concentrados: possuem alto teor energético por unidade de volume, ou seja, com menos de 18% de FB na MS e podem ser classificados como **protéicos** quando apresentam mais de 20% de proteína bruta (PB) na MS, como é o caso dos farelos de algodão, de soja; ou **energéticos** quando apresentam menos de 20% de PB na MS como, por exemplo, o milho, o sorgo, a raiz da mandioca, o farelo de arroz.

Vitaminas: são substâncias orgânicas especiais, que atuam frequentemente como coenzimas, ativando numerosas enzimas importantes para o metabolismo dos seres vivos. São indispensáveis ao bom funcionamento orgânico. Agem em quantidades mínimas e se distinguem das demais substâncias orgânicas porque não são fontes de energia e não desempenham função estrutural. Classificam-se da seguinte maneira:

Classificação	Vitaminas	Nomes
Hidrossolúveis	B1	Tiamina
	B2	Riboflavina
	B6	Piridoxina
	PP	Nicotinamida
	B12	Cobalaminas
	H	Biotina
	P	Rutina
Lipossolúveis	C	Ácido Ascórbico
	A	Retinol
	D	Calciferol
	E	Tocoferol
	K	Filoquinona

Fonte: Andrigueto et al. (1982).

Algumas vitaminas não precisam ser fornecidas via dieta porque são sintetizadas pelo organismo do animal, como por exemplo, as do complexo B, a K e a C.

Minerais: são compostos inorgânicos com diferentes funções no organismo, considerados nutrientes essenciais porque não são produzidos pelo organismo e, por isso, devem ser obtidos por meio da alimentação.

Aditivos: substância adicionada ao alimento para conservar, intensificar ou modificar suas propriedades nutritivas sem prejudicá-las, como por exemplo, antibióticos, conservantes, antioxidantes (vitamina E), tampão, corante, flavorizante, ionóforo.

Portanto, conhecer os alimentos e seu valor na nutrição animal é imprescindível e esta revisão tem por objetivo reunir as principais metodologias de avaliação nutricional de alimentos para ruminantes domésticos enfatizando seus princípios e suas limitações, para que as mesmas sejam utilizadas de maneira mais consciente por estudantes e técnicos de laboratório.

Métodos químicos

Método de Weende

Também conhecido como método de análise centesimal ou proximal, foi proposto por Henneberg em 1894, com base nos resultados de investigações realizadas na Estação Experimental de Weende, na Alemanha. Desde então, esse método vem sendo utilizado para se conhecer a composição química aproximada dos alimentos. As técnicas ainda são quase as mesmas, com exceção do nitrogênio, que é determinado pelo método Kjeldahl (HORWITZ, 2000). De acordo com esse método, os componentes dos alimentos são divididos em:

Alimento			
Matéria seca			Água
Matéria orgânica		Matéria inorgânica (cinzas)	
Compostos não nitrogenados		Compostos nitrogenados (proteínas)	
Carboidratos	Extrato etéreo		
Fibra	Extrato não nitrogenado		

Fonte: Andrigueto et al. (1982)

Dessa forma, as análises realizadas no laboratório são:

Matéria seca (MS): Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. A MS é toda fração do alimento excluída a água ou umidade natural. É um dado de extrema importância, principalmente quando obtido de alimentos volumosos, que normalmente apresentam umidade variável. Assim, por exemplo, uma amostra de milho em grão que tenha 15% de umidade natural apresenta, por diferença, 85% de MS. O teor de umidade entre alimentos é muito variável (de 75% para gramíneas frescas, por exemplo, até 10% para farelos e fenos). Na MS é que estão contidos os nutrientes (carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas). Os resultados da análise química são apresentados com base na MS para permitir que diferentes alimentos sejam comparados quanto as suas características nutricionais, custo de nutrientes, etc., não levando em consideração a fração de água. A composição dos alimentos em tabelas, o cálculo das necessidades dos animais e o consumo de alimentos são expressos em porcentagem de MS (ANDRIGUETO et al., 1982).

A determinação da MS é feita em laboratório utilizando em torno de 1,0 g de amostra moída, a qual deve ser seca em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 100 °C-105 °C por 12 horas. No caso dos volumosos úmidos, a MS deve ser determinada em amostras pré-secas em estufa de circulação forçada a 55 °C-60 °C por 72 horas ou até que o peso da amostra fique constante (ZENEBO et al., 2008).

Outra alternativa para secagem de amostras de tecido vegetal é com o uso de forno de microondas em potência média, ou seja, utilizando-se o nível cinco ou 50% da capacidade do microondas e revolvendo amostra em intervalos regulares de 1 minuto, até o momento em que não há alteração do peso da amostra, em geral, 5 minutos. A utilização do microondas reduz o tempo de secagem e a contaminação bacteriana, resultando em melhor aparência e

qualidade do produto, sem influenciar na composição química do material seco (PASTORINI et al., 2002). Por outro lado, é um método que não permite a secagem de grandes quantidades de amostras, principalmente quando se trata de alimentos volumosos.

Matéria mineral (MM) ou cinzas: A matéria mineral (MM) ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento da amostra seca em temperatura próxima a 550 °C-570 °C. Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem se perder por volatilização. Logo, a mesma amostra utilizada para determinação da MS pode ser levada ao forno mufla por no mínimo 3 horas. Pela diferença entre o valor da MS e da MM, estima-se o teor de matéria orgânica (MO) da amostra (CAMPOS et al., 2004). A partir das cinzas podem-se determinar os teores de minerais como Cálcio e Fósforo a partir da calcinação e preparo de soluções minerais para determinação dos elementos separadamente por leitura no espectrofotômetro de absorção atômica (SILVA; QUEIROZ, 2002).

Fibra bruta (FB): É a fração composta por carboidratos estruturais e obtida após a digestão ácida seguida de digestão básica. Sua determinação é realizada a partir de uma amostra seca e desengordurada do alimento, após análise de extrato etéreo, a qual deve ser submetida à digestão com uma solução ácida e depois com uma solução básica fraca, seguida de filtragem em cadinho de Gooch, cujo resíduo orgânico resultante é queimado em mufla à temperatura de 550 °C (CAMPOS et al., 2004). A sua principal limitação está relacionada com o fato de não separar a celulose da hemicelulose e provocar a perda de parte da lignina (que não é considerada carboidrato) e da hemicelulose. Este método fornece valores baixos devido à utilização de digestão muito drástica, levando à perda de alguns componentes, não sendo mais adequado para a análise de alimentos.

Extrato etéreo (EE): A determinação do EE é feita, na maioria dos casos, pela extração com solventes como, por exemplo, o éter em aparelho do tipo Soxhlet, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Estes conjuntos incluem os ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, as lecitinas, as ceras, os carotenóides, a clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminam A e D, óleos essenciais, etc. (ZENEBON et al., 2008).

Proteína bruta (PB): É determinada indiretamente a partir do valor de nitrogênio total (N), o qual é determinado por um método que se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação. A matéria orgânica existente na amostra é digerida com ácido sulfúrico e um catalizador para que o nitrogênio seja transformado em sal amoniacal (sulfato de amônio). A amostra digerida em ácido é resfriada, diluída em água destilada e alcalinizada com hidróxido de sódio em destilador do tipo Kjeldahl que condensa a amônia desprendida da amostra. A amônia é recuperada em uma solução de ácido bórico e titulada com ácido clorídrico padronizado. Após determinar o N, o teor de PB é estimado multiplicando-se pelo fator de conversão de 6,25, considerando-se que a proporção de N nas proteínas das plantas é igual a 16% (CAMPOS et al., 2004)

A principal limitação dessa metodologia é não considerar a variação no teor de N das diferentes proteínas e não permitir avaliar a qualidade da proteína.

Extrativo não nitrogenado (ENN): Representa “teoricamente” os carboidratos não estruturais e de mais fácil digestão, como os açúcares, o amido e a pectina. É obtido subtraindo-se de 100 a soma de PB, FB, EE e MM (expressos em porcentagem de MS), então: $ENN = 100 - (PB + FB + EE + MM)$.

A principal limitação dessa estimativa é que ela incorpora todos os erros das análises anteriores, principalmente da FB (ANDRIGUETO et al., 1982).

As principais críticas ao método de Weende estão relacionadas ao fato das frações do alimento não serem compostos quimicamente definidos e sim grupos de compostos químicos. Como, por exemplo, a PB que engloba vários compostos nitrogenados, como a amônia, além dos aminoácidos. Da mesma forma, o EE não inclui apenas triglicerídeos, mas também outros compostos solúveis em éter como ceras e pigmentos sem valor nutricional.

Mas, a principal crítica é com relação à FB que não separa a hemicelulose da celulose e considera somente a lignina insolúvel em álcali. Parte da lignina passa a fazer parte do ENN, o que subestima o teor de FB. Por outro lado, no grupo dos ENN encontram-se frações de natureza diversa como, pectina, lignina solúvel em álcali e os carboidratos solúveis em água (amilose e frutose). Nutricionalmente, a FB deveria representar todos os carboidratos de degradação lenta e que ocupam espaço no rúmen. Por isto, a fibra excessiva limita a concentração energética da dieta e pode deprimir o consumo de MS pelo animal. Quimicamente, o ENN deveria representar o amido e os açúcares simples e, por isso, a digestibilidade da FB deveria ser sempre inferior à digestibilidade do ENN. No entanto, não é isso que se observa na prática. Existem várias evidências experimentais (SILVA; QUEIROZ, 2006) mostrando maior digestibilidade da FB comparativamente ao ENN. Este fato inviabiliza o uso deste nutriente como indicador de qualidade dietética. Isto decorre do fato da técnica laboratorial de FB não representar todos os carboidratos de degradação lenta presentes no alimento (VAN SOEST, 1991). Logo, as análises que compõem o sistema de Weende não são satisfatórias sob o ponto de vista nutricional.

Sistema de nutrientes digestíveis totais (NDT)

Como o sistema de Weende é apenas quantitativo e não considera as particularidades do animal e sua capacidade de transformar os nutrientes do alimento, Henry e Morrison desenvolveram em 1910, o sistema NDT para expressar o valor energético dos alimentos e pode ser calculado utilizando-se equações para estimar a digestibilidade de cada um dos nutrientes. Essas equações se baseiam nas seguintes premissas (ANDRIGUETO et al., 1982):

- ✓ O EE é composto por lipídeos e gorduras, que apresentam valor energético 2,25 vezes maior que o dos carboidratos.
- ✓ Todo o N da amostra é de origem protéica.
- ✓ A FB representa a fração menos digestível, ou seja, os componentes estruturais do alimento.
- ✓ O ENN representa os carboidratos altamente digestíveis.

Dessa maneira, os NDT são obtidos pela soma dos teores de proteínas digestíveis (PD), extratos não nitrogenados digestíveis (ENND), fibra digestível (FD) e extrato etéreo digestível (EED). O EED é multiplicado por uma constante de conversão de gorduras em energia (2,25). A fórmula de cálculo dos NDT é a seguinte:

$$\% \text{ NDT} = \% \text{PD} + (\% \text{EED} \times 2,25) + \% \text{FD} + \% \text{ENND}$$

Como há necessidade de estimar a digestibilidade dos nutrientes, a determinação do NDT, na prática, é morosa e cara. Uma maneira mais prática para se calcular os NDT é a partir da energia digestível, tomando-se por base que um Kg de NDT produz cerca de 4.400 Kcal de energia digestível.

No entanto, a estimativa dos valores energéticos dos alimentos correspondente a necessidade dos animais domésticos e aferidas em NDT são restritas para ruminantes por apresentar as seguintes falhas:

- ✓ Não mede a energia em unidade energética e sim em porcentagem.
- ✓ Não considera o incremento calórico.
- ✓ Em alguns alimentos o EE contém outros compostos além de lipídeos.
- ✓ O fator 2,25 para corrigir o valor energético do EE é baseado na relação entre a energia bruta dos líquidos e a energia bruta dos carboidratos.
- ✓ Não se faz correção para o valor energético da proteína.

Método de Van Soest

Proposto em 1965 por Van Soest, esse método considera que os constituintes das plantas podem ser divididos em conteúdo celular (lipídios, compostos nitrogenados, gorduras, amido e outros compostos solúveis em água) e parede celular (proteína insolúvel, hemicelulose, celulose e lignina). O principal diferencial em relação ao método de Weende é com relação à análise de fibra (VAN SOEST, 1994), a qual é subdividida em:

Fibra em detergente neutro (FDN): A célula vegetal é revestida por uma parede celular rígida composta basicamente por celulose, mas em células adultas esta parede sofre um espessamento que pode formar uma segunda parede composta por lignina e hemicelulose. O método de Van Soest consiste, inicialmente, em separar o conteúdo celular da parede celular. Isto é feito aquecendo-se parte da amostra em solução de detergente neutro. O conteúdo celular solubiliza-se no detergente, enquanto a parede celular não, podendo ser separada por filtragem. As frações resultantes são denominadas de solúveis em detergente neutro, e são compostas por proteína, nitrogênio não protéico (NNP), lipídeos, pigmentos, açúcares, ácidos orgânicos e pectina, e FDN (constituída basicamente por celulose), N ligado à fibra, hemicelulose e lignina.

Fibra em detergente ácido (FDA): Quando se utiliza solução de detergente ácido a celulose e a hemicelulose solubilizam-se e a lignina ligada à celulose (lignocelulose) que é separada por filtragem. As duas frações são denominadas, respectivamente, de solúveis em detergente ácido e FDA. A porção solúvel é integralmente aproveitada por ruminantes ou outros herbívoros e parcialmente por monogástricos não herbívoros. A FDA é a porção menos digestível da parede celular das forrageiras pelos microrganismos do rúmen, constituída quase na sua totalidade por lignocelulose, ou seja, lignina e celulose. Logo, a proporção de hemicelulose é determinada pela diferença entre FDN e FDA. A celulose contida na fração FDA, que é parte solúvel em detergente ácido, quando levada a forno mufla, é totalmente queimada. Com isso, podemos, também por diferença entre os pesos, obter a fração de celulose da amostra.

Determinação de minerais

A determinação de minerais em amostras de alimento pode ser quantificada por espectrofotometria com relativa precisão. A análise de macro e microminerais é realizada por digestão nitroperclórica seguida de leitura em espectrofotômetro de absorção atômica com base em curvas-padrão construídas para cada elemento. Os macrominerais (cálcio-Ca, fósforo-P, magnésio-Mg, potássio-K, cloro-Cl, sódio-Na e enxofre-S) são expressos em porcentagem (%) e os microminerais (ferro-Fe, zinco-Zn, manganês-Mn, iodo-I, selênio-Se, cobre-Cu, cobalto-Co e cromo-Cr) na base de miligrama por quilo de alimento (mg/Kg) ou em parte por milhão (ppm). As análises mais comuns são para determinação de Ca e P, pois representam 70% do total de minerais encontrados no corpo do animal, sendo que 90% destes estão presentes nos ossos e dentes.

A tecnologia NIRS (Near Infra Red System)

O espectrômetro NIR ("Near Infrared Reflectance") é um equipamento (Figura 1) de alta precisão que efetua análises de alimentos usando o princípio de emissão de radiação eletromagnética. A energia radiante do infravermelho (IV) é empregada para caracterizar substâncias orgânicas. O espectrômetro NIR se baseia na aplicação da matemática à química analítica (quimiometria). Como o espectro sozinho não significa nada existe a necessidade de se criar um banco de dados com diversas amostras de um mesmo tipo de ingrediente que tenham ampla variabilidade de seus componentes, montando o que chamamos de curva de predição.



Figura 1. Espectrômetro de refletância no infravermelho próximo (NIRS).

Fonte: Foss Nirsystem, Inc. (2010).

São realizadas leituras espectrais em determinados comprimentos de ondas da amostra estabelecendo-se posteriormente uma correlação entre os resultados das análises tradicionais e os espectros conseguidos. Assim por exemplo, consegue-se através de um espectro de uma amostra de milho prever a sua composição de proteína e aminoácidos por comparação com um banco de dados. O método NIRS permite analisar os componentes orgânicos de ingredientes e produtos, desde que haja um banco de dados robusto o suficiente para reconhecer as variações do material analisado. Uma vez montada a curva de predição, a análise do espectro torna-se extremamente simples e rápida, sem a necessidade de reagentes ou diluições. A técnica permite aumentar significativamente o número de dados da composição dos ingredientes, a um custo muito baixo e em tempo curto o suficiente para que o dado seja utilizado na formulação das dietas.

Uma vez criada e validada a biblioteca de espectros, sua facilidade de uso e o baixo custo tornam o método superior às metodologias convencionais. No entanto, por ser uma metodologia secundária, o NIRS não é mais preciso que o método de origem. Além disso, por se tratar de um método indireto a calibração deve ser feita com muito cuidado e com uma seleção de amostras que tenha variabilidade suficiente para representar toda a faixa de trabalho, além das concentrações dos constituintes refletindo sempre nas mesmas frequências (CAMPESTRINI, 2005).

Métodos biológicos

Digestibilidade

A análise químico-bromatológica é o primeiro passo para a determinação do valor nutritivo do alimento, porém não é suficiente para avaliar a capacidade de utilização destes alimentos pelo animal. A informação da qualidade do alimento utilizada pelo animal é dada por meio da

digestibilidade, que é a relação entre a quantidade da fração ingerida do alimento e o que é excretado. Os coeficientes de digestibilidade podem ser estabelecidos para a MS ou energia ou então para cada um dos componentes da matéria orgânica, tais como PB, EE, ENN, FB ou FDA e FDN, seus valores são expressos em percentagem.

Nos ensaios de digestibilidade pode-se determinar a digestibilidade aparente e a digestibilidade verdadeira, sendo que nessa última a fração metabólica, representada por resíduos de bactérias oriundas do processo fermentativo e substâncias endógenas do organismo animal como enzimas digestivas, células de descamação do trato digestório, sais biliares e sais de Ca^{2+} e Mg^{2+} (sob a forma de sabão combinado com lipídeos), é desconsiderado da fração fecal. Como o resíduo metabólico é mais ou menos constante, se expresso por unidade de consumo, a diferença entre as digestibilidades aparente e verdadeira são representadas pela proporção de material metabólico fecal. Logo, o termo digestibilidade aparente não se aplica para a celulose ou a lignina, uma vez que esses componentes não são encontrados na fração metabólica fecal e a digestibilidade aparente representa um valor subestimado, pois além do resíduo indigestível da dieta (principalmente parede celular lignificada) apresenta também resíduos de material metabólico da fração fecal.

Métodos diretos

- Digestibilidade aparente in vitro - técnica de dois estágios

Essa técnica consiste em se deixar as amostras em contato com o conteúdo líquido do rúmen no interior de um tubo de ensaio, onde se tenta reproduzir as condições predominantes do rúmen (presença de microrganismos, anaerobiose, temperatura de 39 °C, poder tampão e pH 6,9) durante 24 horas a 48 horas para sofrer o processo de fermentação. A adição de uma segunda etapa de 48 horas ao método convencional foi proposta por Tilley e Terry (1963) e é recomendável principalmente para forrageiras de alta digestibilidade e ricas em proteína. Neste estágio se acrescenta solução ácida de pepsina com vistas a desdobrar as proteínas.

- Digestibilidade verdadeira in vitro

Algumas modificações e alternativas foram propostas com o objetivo de diminuir o tempo de análise e simplificar o procedimento, uma vez que o longo tempo de análise e o número de etapas são as principais desvantagens do método de dois estágios proposto por Tilley e Terry (1963). Assim, Van Soest (1994) propôs a substituição da segunda etapa do processo (48h com pepsina) in vitro pelo tratamento do resíduo da fermentação do detergente neutro. Neste caso, todo resíduo metabólico é extraído, possibilitando a estimativa da digestibilidade verdadeira. Com esta modificação, o método mantém a precisão, além de requerer metade do tempo despendido no método de Tilley e Terry (1963).

- Digestibilidade in vitro e produção de gases

É um método indireto para avaliar o desaparecimento da MS de alimentos volumosos pelo resíduo remanescente da digestão microbiana. É pela curva de produção de gás obtida pela digestão do alimento que é possível estimar as taxas de degradações das frações solúveis (açúcares solúveis e amido prontamente disponível) e insolúveis (celulose, hemicelulose). Nesse sistema, são obtidas estimativas do tempo de colonização, a taxa de degradação e a extensão da degradação mais rapidamente que em outras técnicas (CAMPOS et al., 2001). A técnica utiliza líquido ruminal ou enzimas digestivas, visando reproduzir as condições favoráveis à fermentação do rúmen-retículo, como o pH de aproximadamente 6,9, poder tampão, temperatura de 39 °C, anaerobiose e presença de microrganismos para estimar a digestibilidade da MS e fibra (CAMPOS et al., 2004).

Este método tem sido bastante utilizado e aperfeiçoado visando maior precisão com relação aos resultados *in vivo*, que por serem realizados no próprio animal *vivo* são considerados mais confiáveis, porém apresentam inconvenientes, como elevada quantidade de ração, grande número de repetições e alto custo, aumentando a procura pelas técnicas *in vitro* (BERCHIELLI et al., 2006).

A obtenção dos parâmetros de produção de gases é realizada por leituras em tempos pré-estabelecidos, por meio de um aparelho transdutor de pressão, com os valores obtidos convertidos em volume de gases produzidos. Esta técnica possibilita a estimativa da digestibilidade do alimento por correlação entre a produção microbiana de gás e a matéria orgânica fermentada e quando se utiliza um sistema computadorizado para monitoramento automático da digestão, esse método torna-se prático e preciso (CAMPOS et al., 2001).

Considerando as vantagens apresentadas pela técnica de digestibilidade *in vitro* e as questões de bem-estar animal, se tem impulsionado a estimativa da produção de gases durante o processo fermentativo *in vitro* para avaliação de alimentos para ruminantes, visando a obtenção de resultados acurados, gerando menor impacto ambiental e reduzindo a necessidade de animais nos experimentos.

- Digestibilidade aparente *in vivo*

Neste caso, os animais são mantidos em gaiolas metabólicas (Figura 2) providas de comedouros, saleiros, bebedouros e dispositivos para coleta de urina (Figura 3), no caso dos estudos de balanço nitrogenado. Nos ensaios de digestibilidade, os animais são alimentados durante uma semana com quantidades conhecidas de alimento e a produção de fezes é medida pela coleta total de fezes com o auxílio de sacolas que são adaptadas aos animais, que evitam a contaminação com a urina (Figura 4).



Figura 2. Gaiola metabólica.

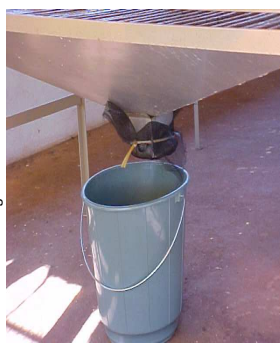


Figura 3. Coleta de urina.



Figura 3. Coleta total de fezes.

Na determinação da digestibilidade, consideram-se os nutrientes ingeridos e os recuperados nas fezes, calculando-se o coeficiente de digestibilidade (CD) por diferença:

$$CD = \frac{(\text{Nutriente ingerido} - \text{Nutriente excretado nas fezes})}{\text{Nutriente ingerido}} \times 100$$

Este método apresenta como principais desvantagens, a necessidade de grande número de animais (pelo menos quatro animais por tratamento) e a elevada demanda de forragem para alimentação dos mesmos, por esse motivo, a maioria dos ensaios de digestibilidade com ruminantes são executados com ovinos.

Métodos indiretos com uso de indicadores ou marcadores

Esta técnica foi desenvolvida considerando-se a impossibilidade de se fazer a coleta total de fezes, especialmente no caso de animais mantidos em sistemas de pastejo. O uso de indicadores em experimentos é importante para se estimar o consumo e a excreção fecal, e com base nesses parâmetros determinar a digestibilidade.

A principal característica de um bom marcador é que o mesmo seja completamente recuperado nas fezes. Se não houver uma boa recuperação do marcador, o desaparecimento do alimento será a soma da passagem mais a aparente digestão. Neste caso, a aparente digestão surge do erro resultante da deficiência na recuperação do marcador.

As demais características desejáveis nos marcadores são:

- ✓ Devem ser substâncias indigestíveis e não assimiláveis pelo organismo.
- ✓ Não apresentar nenhuma ação farmacológica sobre o trato digestivo.
- ✓ Deve misturar-se uniformemente com o alimento a ser testado.
- ✓ Deve ser de fácil quantificação analítica.
- ✓ De preferência, ser um componente natural do alimento a ser testado.

O indicador externo mais utilizado é o óxido crômico (Cr_2O_3). Apesar de ser o indicador mais utilizado, apresenta como desvantagem não se misturar bem à dieta.

Os indicadores internos mais utilizados são: lignina, sílica e cinza insolúvel em detergente ácido (CIA), apresentam as vantagens de ocorrência natural nos alimentos e não sofrem variações acentuadas na excreção fecal, como no caso de indicadores externos.

A estimativa da digestibilidade (D), nesse caso, é realizada da seguinte maneira:

$$D = 100 - \frac{\text{concentração do indicador no alimento} \times \text{nutriente nas fezes}}{\text{concentração do indicador nas fezes} \times \text{nutriente no alimento}} \times 100$$

- Marcadores internos

Os marcadores internos são componentes químicos que ocorrem naturalmente na dieta do animal. Devem ser indigestíveis e quantitativamente recuperáveis nas fezes.

Este método se baseia no fato de que, a medida que o alimento passa pelo trato digestivo, a concentração do indicador aumenta progressivamente pela remoção de outros constituintes por digestão e absorção. O aumento da concentração é proporcional à digestibilidade (D) e, portanto, esta última pode ser calculada a partir das concentrações do marcador no alimento e nas fezes, por meio da seguinte equação:

$$D = 1 - \frac{\text{concentração do marcador no alimento}}{\text{concentração do marcador no alimento}}$$

Como marcadores internos têm sido utilizados os seguintes componentes:

Lignina: A lignina é um polímero de unidades de fenilpropanóides que ocorre na parede celular das plantas forrageiras. Teoricamente a digestibilidade da lignina é igual a zero (lignina verdadeira). Entretanto, em gramíneas jovens e em outras espécies com baixo conteúdo de lignina, pode-se encontrar uma aparente digestibilidade para lignina, o que resulta em erros na estimativa da

digestibilidade da forrageira. A deficiência da recuperação da lignina nas fezes, é decorrente de alguns fatores, tais como: em gramíneas jovens a lignina possui menor grau de polimerização e os fragmentos de baixo peso molecular são absorvidos e excretados via urina; a lignina bruta pode sofrer contaminação de outros componentes do alimento (reação de Maillard); pode ocorrer formação de material fenólico solúvel, além de que, frações muito pequenas são perdidas durante o processo de filtragem.

Na prática, o uso da lignina bruta com indicador apresenta algumas restrições, pelos motivos citados acima, o que pode ocasionar erros nas determinações e comprometer a estimativa dos valores de digestibilidade e consumo.

Alcanas: Alcanas são hidrocarbonetos de cadeia longa (21-37 C) que fazem parte da cutícula das forrageiras. São razoavelmente indigestíveis e recuperáveis nas fezes. A simplicidade relativa da análise destes compostos por cromatografia de gás e sua relativa inércia, foram as razões principais para considerar sua utilização como marcadores, inicialmente com o propósito de determinar a digestibilidade da dieta e, posteriormente, para determinação do consumo de forragem.

Como as alcanas com número par de carbonos representam menos de 6% de todas as alcanas presentes nas plantas, Mayes et al. (1986), propuseram um método para estimação direta do consumo baseado na combinação do uso de uma alcana como marcador interno e uma alcana como marcador externo, com tamanho de cadeia similar. O princípio se baseia no uso das alcanas ímpares como marcadores internos e dosificação de alcanas pares como marcadores externos.

Os resultados de Mayes et al (1986), sugeriram que uma estimativa acurada do consumo de forragem foi possível com o uso simultâneo de alcanas C32, como marcador externo, e C33 como marcador interno (presente no alimento). Evidenciou-se, também, que a recuperação do marcador nas fezes foi proporcional ao tamanho da cadeia de carbonos da alcana.

Para que o consumo de forragem seja estimado com acurácia, tem sido recomendado que a concentração de alcanas na forragem deva exceder 50 mg/Kg de MS (LAREDO et al., 1991). Entretanto, algumas forrageiras tropicais contêm quantidades insuficientes de alcanas C33, nestas espécies, alcanas de cadeia curta podem ser usadas, ocasionando, contudo, redução na acurácia da estimativa (LAREDO et al., 1991).

Portanto, apesar de recente, esta técnica parece promissora, levando-se em conta a boa precisão de suas estimativas, como demonstrado na literatura (LAREDO et al., 1991). Entretanto, é necessário maior conhecimento da concentração de alcanas de cadeia C33 nas diferentes espécies de gramíneas forrageiras, para que uma redução de acurácia da determinação da digestibilidade e do consumo, não comprometa a utilização desta técnica.

Celulose potencialmente indigestível e cinza insolúvel em ácido: Minerais insolúveis na dieta animal aparecem de duas formas: na fração mineral biogênica da forragem e da contaminação do solo. Animais que ingerem solo durante o pastejo tendem a reter partículas minerais no rúmen, que podem posteriormente mascarar a estimativa de cinzas nas fezes. Portanto essa é uma importante fonte de erros quando se utiliza a cinza insolúvel em ácido para determinação da digestibilidade.

Penning e Johnson (1983) relataram diferenças nas predições da digestibilidade da alfafa (*Medicago sativa*) e do azevém (*Lolium multiflorum*), estimada por meio da cinza insolúvel em ácido, quando comparadas com a digestibilidade “in vivo”. Em alfafa as predições foram inconsistentes, enquanto que para o azevém foram obtidas melhores estimativas da digestibilidade. Em decorrência da alta variabilidade encontrada na estimativa da digestibilidade para animais recebendo alfafa, os autores concluíram pela não recomendação da cinza insolúvel em ácido como marcador interno.

A celulose potencialmente indigestível é um marcador interno que permite boa predição da digestibilidade (PENNING; JOHNSON, 1983). O uso deste marcador apresenta como principais desvantagens o requerimento de animais fistulados no rumem e o longo tempo necessário para que ocorra a digestão das amostras (10 dias). Por isso, esta técnica parece impraticável somente quando a determinação da celulose potencialmente indigestível requer um grande número de amostras.

Fibra digestível em detergente ácido: Este marcador tem mostrado boa performance na determinação da digestibilidade de forrageiras.

A obtenção da fibra insolúvel em detergente ácido consiste em incubar a fibra, isolada com detergente ácido, em solução de celulase. O resíduo é usado como marcador interno.

Segundo Penning e Johnson (1983) o uso deste marcador, além de apresentar elevada precisão na determinação de digestibilidade de forrageiras, é relativamente simples, apesar de necessitar de animais fistulados no rúmen.

Van Soest (1994), propõe um método simples, no qual apenas a análise fecal é necessária para se determinar a digestibilidade da dieta animal. Na MS fecal, além do resíduo indigestível oriundo do alimento, é encontrada uma quantidade residual de origem metabólica, variável com a espécie e condições fisiológicas do animal e com o consumo, e se fixada à espécie, o valor metabólico residual se torna mais ou menos constante. Pesquisas obtidas por Van Soest (1994), têm mostrado que o valor da constante metabólica (Mi) varia de 11,9 a 12,9. A seguinte relação é utilizada para cálculo da indigestibilidade (Ra):

$$Ra = \frac{\text{constante metabólica (11,9 – 12,9)}}{\text{fração metabólica das fezes}}$$

A fração metabólica é obtida pelo tratamento da MS fecal com detergente neutro. Neste caso, o resíduo do tratamento representa o material indigestível do alimento (resíduo de origem alimentar) e a quantidade solubilizada representa a fração metabólica oriunda de substâncias endógenas e de bactérias do processo fermentativo.

Obtendo-se a indigestibilidade do alimento, pode-se chegar à digestibilidade aparente subtraindo-se de 100 o valor da digestibilidade. A digestibilidade verdadeira é obtida adicionando-se o valor da digestibilidade aparente à constante metabólica, ou seja, o valor de 11,9 ou 12,9. Esta é uma metodologia simples e rápida, e serve, principalmente para comparar diferentes tratamentos experimentais.

- Marcadores externos

Uma substância adicionada à dieta como marcador é conhecida como marcador externo. Pode ser usado para estudo da digestibilidade, quando adicionado em nível constante; ou para estudo sobre taxas de passagem e fluxo da digesta, quando adicionado em doses variadas.

O marcador externo deve ser recuperado completamente nas fezes (logo, deve ser indigestível) e não poder ser absorvido pelas paredes do trato digestivo. Além disso, não deve afetar o animal ou a digestibilidade do alimento, e deve estar ausente do alimento e do solo. Vários marcadores indigestíveis têm sido usados em estudos de digestão, entretanto o material mais comumente utilizado é óxido crômico (Cr_2O_3). A concentração do óxido crômico nas fezes alcança o equilíbrio seis a sete dias após a administração das doses iniciadas e sua taxa de recuperação pode ser considerada de 100%. O modo de fornecimento pode ser uma ou duas vezes ao dia em cápsulas de 1 g a 10 g de óxido crômico.

Como relatado anteriormente, para marcadores internos, é possível estimar consumo de animais em pastejo pelo método da relação produção fecal/indigestibilidade. Neste caso, a produção fecal é estimada a partir da ingestão diária de cromo e do teor de cromo na matéria orgânica (ou MS) fecal.

Métodos indiretos in situ

Na técnica de incubação no rúmen de amostras de alimento contidas em bolsas de náilon, também conhecida como técnica da degradação in situ, o substrato (amostra de alimento) é colocado dentro do rúmen de um animal fistulado em sacos de náilon que são firmemente amarrados em uma corrente contendo um peso (0,5-1,0 kg) na extremidade para evitar que as bolsas fiquem flutuando sobre o conteúdo ruminal. Essas bolsas são removidas após diferentes períodos de incubação (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) para se determinar o desaparecimento da amostra (LUCCI, 1997).

Coloca-se de 3 g a 5 g de alimento moído nas bolsas de náilon de tamanho 6 cm x 15 cm ou 7 cm x 12 cm com porosidade de 50 µm. Após a retirada as bolsas do rúmen, estas são lavadas em água corrente até a água sair limpa. Em seguida, são secas em estufa a 55 °C por 24 horas. Analisa-se o conteúdo do nutriente (Ex: MS, FDN, FDA, etc) na amostra e no resíduo remanescente nas bolsas após a incubação no rúmen (CAMPOS et al., 2004).

Os dados de desaparecimento são ajustados por regressão não-linear, que prediz a degradabilidade potencial (DP) dos alimentos por meio do modelo proposto por Mehrez e Ørskov (1977):

$$DP = a + b(1 - e^{-ct})$$

Onde: *a* é a fração solúvel; *b*, a fração potencialmente degradável; *c*, a taxa de degradação da fração *b*; e *t*, o tempo de incubação.

A degradabilidade efetiva (DE) é calculada segundo o modelo matemático proposto por Ørskov e McDonald (1979):

$$DE = a + ((b \cdot c)/(c + k))$$

Onde: *k* é a taxa estimada de passagem de sólidos no rúmen (2, 5 ou 8%/h).

Os parâmetros não-lineares *a*, *b* e *c* são estimados pelo procedimento algorítmico de Gauss Newton.

Considerações finais

O conhecimento da composição química e da digestibilidade dos alimentos se faz necessário para que as dietas sejam formuladas de acordo com os requerimentos nutricionais dos animais (que varia em função da categoria) e de acordo com a disponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos utilizados, a fim de diminuir excreções desnecessárias de nutrientes ou gases no meio ambiente, o que pode contribuir para elevar impactos ambientais e prejuízos para o produtor, pois quando se usa alimentos além do necessário há uma gasto inútil com rações, pois o excesso não será utilizado pelo animal e sim desviado para rota de excreção.

Atualmente os comitês de ética no uso de animais (CEUAs) dos centros de pesquisas e universidades atuam cada vez mais, estimulando a diminuição do uso de animais em experimento por questões relacionadas a má manipulação e uso de número excessivo de

animais. Isso torna cada vez mais viável a busca por técnicas de avaliação de alimentos in vitro, o que implica em desenvolvimento de técnicas mais elaboradas para tais análises, pois revistas científicas de alto padrão já exigem que os trabalhos submetidos, apresentem na metodologia o protocolo de envio a CEUA e liberação para execução do experimento.

Referências

- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A. de; BONA FILHO, A. **Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal - os Alimentos**, Vol. I, São Paulo:Nobel, 1982. 395 p.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583 p.
- BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba.
- CAMPESTRINI, E. Utilização de equipamento NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) nos estudos de valores nutricionais (composição química e digestibilidade) de alimentos para não ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 5, p. 240-251, 2005. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/042V4N2P395_404_MAR2007.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2010.
- CAMPOS, F. P.; SAMPAIO, A. A. M.; VIEIRA, P. F.; BOSE, M. L. V. Digestibilidade in vitro/gás de volumosos exclusivos ou combinados avaliados pelo resíduo remanescente da digestão da matéria seca e produção de gás. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v. 30, n. 5, p. 1579-1589, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v30n5/6699.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2010.
- CAMPOS, F. P. de; NUSSIO, C. M. B.; NUSSIO, L. G. **Métodos de análise de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, [2004]. 135 p.
- FOSS NIRSYSTEM, INC. Página institucional. Disponível em: <<http://www.foss-nirsystems.com/nutraceuticals.html>>. Acesso em: 10 mar. 2010.
- HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2000. 2v.
- LAREDO, M. A.; SIMPSON, G. D.; MINSON, D. J. The potential for using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter by grazing ruminants. **Journal of Agricultural Science**, Tokio, v. 117, p. 355-361, 1991.
- LUCCI, C. de S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, 1997. 169p.
- MAYES, R. W.; LAMB, C. S.; COLGROVE, P. M. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. **Journal of Agricultural Science**, Tokyo, v. 107, p. 161-170, 1986.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, Tokio, v.88, n.3, p.645-650, 1977.
- ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.92, n.2, p.499, 1979.
- PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; ABREU, C. M. Secagem de material vegetal em forno de microondas para determinação de matéria seca e análises químicas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, MG, v. 26, n. 6, p. 1252-1258, 2002. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/site/_adm/upload/revista/26-6-2002_18.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2010.
- PENNING, P. D.; JOHNSON, R. H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 1. Potentially indigestible cellulose and acid insoluble ash. **Journal of Agricultural Science**, Tokio, v. 100, p. 127-31, 1983.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos** 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235 p.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A twostage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. D.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583- 3597, 1991.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed.; versão digital. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008. 1020 p. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=0&func=startdown&id=1> . Acesso em: 20 abr. 2010.

Embrapa

Rondônia

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

